

**Análises de Multirresíduos de Pesticidas
em Cebola Empregando Cromatografias
Líquida e Gasosa Acopladas à
Espectrometria de Massas**



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2017

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Semiárido

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 132

Análises de Multirresíduos de Pesticidas em Cebola Empregando Cromatografias Líquida e Gasosa Acopladas à Espectrometria de Massas

Paula Tereza de Souza e Silva

Debora Renata Cassoli de Souza

Vera Lúcia Ferracini

Embrapa Semiárido

Petrolina, PE

2017

Esta publicação está disponibilizada no endereço:
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

Embrapa Semiárido

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23 56302-970 Petrolina, PE

Fone: (87) 3866-3600 Fax: (87) 3866-3815

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros: Diana Signor Deon

Elder Manuel Moura Rocha

Francislene Angelotti

Gislene Feitosa Brito Gama

José Mauro da Cunha e Castro

Juliana Martins Ribeiro

Mizael Félix da Silva Neto

Pedro Martins Ribeiro Júnior

Roseli Freire de Melo

Sidinei Anunciação Silva

Tadeu Vinhas Voltolini

Supervisor editorial: Sidinei Anunciação Silva

Revisor de texto: Sidinei Anunciação Silva

Normalização bibliográfica: Sidinei Anunciação Silva

Foto da capa: Paula Tereza de Souza e Silva

Editoração eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

1ª edição (2017):

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

**CIP - Brasil. Catalogação na publicação
Embrapa Semiárido**

Silva, Paula Tereza de Souza e.

Análises de multirresíduos de pesticidas em cebola empregando cromatografias líquida e gasosa acopladas à espectrometria de massas / Paula Tereza de Souza e Silva, Debora Renata Cassoli de Souza Dutra, Vera Lúcia Ferracini – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2017.

21 p. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 132).

1. Resíduo químico. 2. Análise química. 3. Agrotóxico. 4. *Allium cepa* L. I. Silva, Paula Tereza de Souza e. II. Dutra, Debora Renata Cassoli de Souza. III. Ferracini, Vera Lúcia. IV. Título. V. Série.

CDD 635.25

© Embrapa 2017

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	15
Conclusão	19
Agradecimentos	19
Referências	19

Análises de Multirresíduos de Pesticidas em Cebola Empregando Cromatografias Líquida e Gasosa Acopladas à Espectrometria de Massas

Paula Tereza de Souza e Silva¹

Debora Renata Cassoli de Souza²

Vera Lúcia Ferracini³

Resumo

O uso indiscriminado dos pesticidas vem trazendo preocupação, principalmente quanto à segurança alimentar com relação às frutas e hortaliças. Neste contexto, foi validado um método multirresíduo capaz de detectar e quantificar resíduos de pesticidas que são empregados na cebolicultura do Vale do São Francisco. Para a extração dos pesticidas, utilizou-se o método de extração QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) e determinação por GC-MS/MS triplo quadrupolo e UPLC-ESI-MS/MS triplo quadrupolo. Esse método foi validado com boa linearidade ($R > 0,99$) para os pesticidas estudados na matriz cebola. As recuperações variaram de 63,1% a 96,2% com desvio padrão relativo (RSD) de até $< 11,5\%$ para a técnica de GC-MS/MS, enquanto para UPLC-ESI-MS/MS, as recuperações variaram de 64,5% a 89,2% com desvio padrão relativo (RSD) de até $< 16,5\%$. Para a análise por GC-MS/MS, o limite de detecção (LD) foi de 0,005 mg kg⁻¹ e quantificação (LQ) 0,01 mg kg⁻¹ (exceto para deltametrina, limite de quantificação 0,05 mg kg⁻¹) e para o UPLC-ESI-MS/MS, LD 0,02 mg kg⁻¹ e LQ 0,1 mg kg⁻¹. O método proposto é capaz de

¹Química, D.Sc. em Química, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

²Química, D.Sc. em Química, analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

³Química, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP.

quantificar 31 pesticidas na cebola, a qual atendeu os limites máximos recomendados pela legislação brasileira. Das 15 amostras de cebola analisadas, não foi detectada a presença de resíduos de nenhum dos compostos analisados.

Palavras-chave: QuEChERS, pesticidas, cebola, GC-MS/MS, LC-ESI-MS/MS.

Multiresidue Analysis of Pesticides in Onion Using Liquid and Gas Chromatography Combined With Mass Spectrometry

Abstract

The indiscriminate use of pesticides has been a growing concern throughout the world, especially with regard to the safety of ingesting fruit and vegetables. In this context, a multi-residue method was validated to detect and quantify pesticide residues employed on onion crops in the São Francisco River Valley of Brazil. The pesticides were extracted using the QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method and determined by triple quadrupole GC-MS/MS and triple quadrupole UPLC-ESI-MS/MS. The method was validated and good linearity was found ($r > 0.99$) for the pesticides studied on the onion matrix. With GC-MS/MS, recoveries ranged from 63.1 to 96.2%, with a relative standard deviation (RSD) of $< 11.5\%$. With UPLC-ESI-MS/MS, recoveries ranged from 64.5 to 89.2% with RSD of $< 16.5\%$. For the GC-MS/MS analysis, the detection limit was 0.005 mg kg⁻¹ and the limit of quantification was 0.01 mg kg⁻¹, except deltamethrin, for which the quantification limit was 0.05 mg kg⁻¹. For the UPLC-ESI-MS/MS analysis, the detection limit was 0.02 mg kg⁻¹ and the limit of quantification was 0.1 mg kg⁻¹. The proposed method is capable of quantifying 31 pesticides on onions. No residues were detected in any of the 15 samples analyzed.

Keywords: QuEChERS, pesticides, onion, GC-MS/MS, UPLC-ESI-MS/MS.

Introdução

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma das oleráceas mais consumidas no mundo. No Brasil, é a terceira mais importante em termos de valor econômico, sendo destaque de produção o Sul e o Nordeste. No Nordeste brasileiro, a cebola foi introduzida no final da década de 1940 e é predominantemente produzida no Submédio Vale do São Francisco, merecendo destaque os municípios de Casa Nova e Sento Sé, que são dois dos maiores produtores do Estado da Bahia. O seu cultivo é realizado durante o ano todo, embora, nos meses de janeiro a março, haja uma maior concentração (COSTA, 2012).

Existe uma preocupação com essa cultura, pois é suscetível a pragas e a doenças, cujos controles são realizados pelo uso de pesticidas (RODRIGUES et al., 2011), um dos problemas enfrentados pelos produtores no plantio de olerícolas nesses municípios. Nesse contexto, há a necessidade de se desenvolver um método capaz de analisar pesticidas na cebola, pois é importante conhecer a qualidade do bulbo comercializado pelos produtores para garantir a segurança alimentar dos consumidores.

Recentemente, alguns trabalhos foram publicados, desenvolvendo metodologia para a extração e determinação de pesticidas em cebola. Rodrigues et al. (2011) otimizaram um método para a determinação de cinco pesticidas em cebola, empregando o método de extração QuEChERS e sua determinação por cromatografia líquida, acoplada ao analisador de massas triplo quadrupolo (LC-ESI-MS/MS); Chowdhurry et al. (2013) desenvolveram um método para análise de 19 pesticidas em vegetais frescos – tomate, cenoura, batata, cebola, couve-flor, pepino, repolho e berinjela – empregando a extração por solvente e cromatografia gasosa, acoplada a espectrometria de massas (GC-MS); Sivaperumal et al. (2015) desenvolveram um método para analisar 60 pesticidas em maçã, banana, couve-flor, repolho, uva, manga, cebola, laranja, batata, tomate, goiaba, romã e quiabo, empregando a extração em fase sólida e cromatografia líquida ultra rápida acoplada ao

analisador de massa tempo de voo espectrômetro de massa (UPHLC/TOF-MS); Dasenaki et al. (2016) analisaram três pesticidas em cebola e também em intervalos de pré-colheita empregando QuEChERS e LC-ESI-MS/MS.

O preparo de amostra por QuEChERS em frutas e vegetais tem sido empregado, pois se trata de um método eficiente com minimização do uso de solventes orgânicos, e rapidez, além de atender os rigorosos limites máximos de resíduos determinados por legislações internacionais (DASENAKI et al., 2016; LÓPEZ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). Esse método, desenvolvido por Anastassiades et al. (2003), tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Existem três tipos desse método: QuEChERS original, QuEChERS acetato e QuEChERS citrato. Todos se baseiam nas seguintes etapas: extração com acetonitrila, seguida da partição promovida pela adição de sais; etapa de *clean up*, denominado extração em fase sólida dispersiva. Para o QuEChERS acetato e citrato, o efeito tamponante é adicionado na etapa de adição de sais, pois muitos compostos apresentam problemas de estabilidade e/ou recuperação de acordo com pH da matriz (PRESTES et al., 2011). Os extratos gerados por esse método podem ser analisados por cromatografia líquida ou gasosa acoplados à espectrometria de massas.

A maioria das análises de controle de resíduos de pesticidas de rotina necessita da combinação da cromatografia gasosa com a líquida (LÓPEZ et al., 2014). A cromatografia gasosa é empregada para a análise de pesticidas voláteis e termicamente estáveis, em temperaturas relativamente elevadas empregadas durante o processo de separação cromatográfica (CHOWDHURY et al., 2013; SHANSIPUR et al., 2016). Já a cromatografia líquida tem sido mais utilizada para a determinação de pesticidas termicamente instáveis e não voláteis, que não podem ser analisados por GC (DASENAKI et al., 2016; HANOT et al., 2015; LÓPEZ et al., 2009; SHANSIPUR et al., 2016; SIVAPERUMAL et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi validar um método multirresíduo capaz de detectar e quantificar resíduos de pesticidas que são empregados na cebolicultura no Submédio do Vale do São Francisco empregando

a extração QuEChERS e determinação por cromatografia gasosa, acoplada ao analisador de massa triplo quadrupolo (GC-MS/MS) e cromatografia líquida ultrarrápida, acoplada ao analisador de massa triplo quadrupolo (UPLC-ESI-MS/MS).

Material e Métodos

Os pesticidas foram selecionados a partir de questionários aplicados em propriedades de produtores de cebola nos municípios de Sento Sé e Casa Nova, no Vale do São Francisco, no Estado da Bahia. Foi realizada aplicação de 60 questionários com os principais produtores de cebola que se encontram nesses municípios, ao redor do lago do Sobradinho, BA. Foram selecionados 31 pesticidas para serem analisados em amostras de cebola dessa região. Muitos dos pesticidas não possuem limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido para a cultura da cebola, porém, foram escolhidos por serem utilizados na região e possíveis de ser determinados em laboratório.

Os solventes orgânicos foram acetonitrila e metanol, grau HPLC. Os reagentes sulfato de magnésio anidro, cloreto de sódio e citrato de trissódio dihidratado; hidrogeno citrato de dissódio sesquihidratado foram de pureza que variaram entre 99,05 e 99,9. A água foi purificada em sistema Milli-Q Simplicity 185 .

Os padrões dos pesticidas selecionados, com grau de pureza na faixa de 93-99,5% foram acetocloro, aldicarbe, aldrin, ametrina, azoxistrobina, carbofurano, cipermertrina, ciproconazol (mistura de isômeros), clorpirifós, clorpirifós metil, deltametrina, dimetoato, endossulfan (alfa, beta e sulfato), fenarimol, hexaclorobenzeno, imidacloprido, iprodiona, lambda cialotrina, metalaxil, metomil, oxadiazon, oxifluorfen, pendimetalina, profenofós, simazina, tebuconazol, tiametoxan, triazofós e triadimenol.

As amostras de cebola recebidas no laboratório foram congeladas e processadas, utilizando-se um processador industrial. As amostras foram armazenadas a -20 °C. A metodologia de extração foi QuEChERS

(ANASTASSIADES et al., 2003) com modificação, empregando-se tampão citrato.

Um total de 10 g cebola congelado foi pesado em tubos teflon com capacidade de 50 mL e extraída com 10 mL de acetonitrila. Essa mistura foi agitada vigorosamente durante 1 minuto por vórtex. Após a agitação, foram adicionados 4 g de sulfato de magnésio anidro, 1 g de cloreto de sódio anidro, 1 g citrato de trissódio dihidratado e 0,5 g de hidrogeno citrato de dissódio sesquihidratado. O tubo foi agitado por 1 minuto e centrifugado durante 5 minutos a 10.000 rpm a 10 °C. Para a etapa de purificação, 5 mL da camada superior foram transferidos para o tubo de centrifuga (10 mL) contendo 125 mg de PSA e 750 mg de sulfato de magnésio anidro. Essa mistura foi novamente agitada (30 segundos) e centrifugada a 3.500 rpm por 5 minutos. Desse extrato, 2 mL foram filtrados com filtro de seringa para o vial e injetado no UPLC-ESI-MS/MS (cromatografia líquida ultrarrápida, acoplada ao analisador de massa triplo quadrupolo).

Outros 2 mL foram transferidos para o tubo de vidro e evaporados até secura, sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi redissolvido em 0,5 mL acetato de etila, filtrado em filtro de 0,45 μm diretamente no vial e injetado no GC-MS/MS (cromatografia gasosa acoplado ao analisador de massa triplo quadrupolo. Foram analisadas 15 amostras de cebola oriundas de áreas de produtores dos municípios de Casa Nova e Sento Sé e as fortificações foram realizadas em cebola orgânica produzida pela Embrapa Semiárido.

As soluções padrões estoques de pesticidas, contendo 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada pesticida, foram preparadas pela dissolução dos padrões em metanol ou acetona dependendo da solubilidade do pesticida. As soluções foram estocadas e armazenadas em freezer a -18 °C. A partir das soluções estoques, foram preparadas soluções de trabalho de concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as quais foram diluídas para a otimização dos parâmetros de fragmentação, preparo das curvas analíticas e na avaliação dos parâmetros de exatidão e precisão.

Para a quantificação dos analitos, foi utilizado um cromatógrafo , acoplado a um triplo quadrupolo (Quattro micro Micromass) e equipado com injetor automático Comb Pal CTC, utilizando-se uma coluna J&W Scientific DB5-MS (30 m x 0,25 d.i x 0,25 μ de tamanho de partícula). Hélio (pureza 99,9999%) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. O injetor foi PTV (*programmed temperature vaporizer*) em modo solvent vent com temperatura inicial 50 °C mantida por 0,25 minuto com rampa de 12 °C/s até 280 °C e tempo de hold 20 minutos. O volume de injeção foi de 3 μ L. A temperatura do forno foi iniciada a 50 °C (durante 1,5 minuto) seguido por uma rampa de temperatura de 25 °C/min até 150 °C e aumento de 5 °C/min até 280 °C mantendo por 4 minutos e com tempo total de 36 minutos.

O espectrômetro de massa foi operado com fonte de impacto de elétrons (IE) a 70eV, a temperatura da fonte foi de 200 °C e da interface de 280 °C. O modo MRM (*multiple reaction monitoring*) foi programado e selecionado para cada pesticida, com duas transições, sendo uma para a quantificação e outra para confirmação. Para a otimização da análise no equipamento, foram realizadas corridas em modo *scan* para cada um dos pesticidas, sendo selecionado o íon majoritário e verificado o tempo de retenção de cada um.

Em seguida, utilizando-se gás argônio ($2,5 \times 10^{-3}$) como colisão, foram selecionados os íons secundários para a quantificação e confirmação. Selecionadas as duas transições, foram realizadas análises no UPLC-ESI-MS/MS com diferentes energias de colisão (5, 10, 15, 20, 25 e 30). As energias de colisão que geraram maior sensibilidade tanto para a quantificação como para confirmação foram as estabelecidas e usadas na validação e análise (Tabela 1).

Na Tabela 1 são apresentados os tempos de retenção dos pesticidas, energia de colisão e transições utilizadas no método para quantificação por GC-MS/MS.

Tabela 1. Condições para a determinação dos pesticidas por GC-MS/MS.

Composto	t _R (min)	MRM transição (m/z)	Energia de colisão (eV)
Hexaclorobenzeno (HCB)	13,14	284 > 249	20
		284 > 214	10
Simazina	13,77	201 > 173	10
		201 > 186	5
Acetocloro	16,02	223 > 146	5
		223 > 208	10
Clorpirifós- metil	16,06	197 > 134	20
		197 > 169	15
Metalaxil	16,61	206 > 162	5
		206 > 132	15
Ametrina	16,69	227 > 185	5
		227 > 212	5
Aldrin	17,50	261 > 191	30
		263 > 228	20
Clorpirifós	17,72	314 > 258	12
		197 > 169	10
Pendimetalina	18,90	252 > 162	5
		251 > 191	5
Endosulfan Alfa-	20,46	241 > 170	15
		241 > 206	8
Profenofós	21,24	337 > 266	8
		207,9 > 63	25
Oxadiazon	21,42	175 > 112	10
		175 > 76	25
Oxifluorfen	21,66	252 > 224	5
		252 > 196	20
Endosulfan Beta-	22,63	237 > 119	20
		237 > 143	20
Triazofós	23,04	257 > 162	10
		257 > 119	22
Endosulfan Sulfato-	24,02	272 > 237	12
		387 > 241	15
Lambda Cialotrina	28,02	197 > 141	5
		197 > 161	5
Iprodiona	28,02	314 > 245	10
		314 > 271	6
Cipermetrina	31,2-31,5-31,6-31,7	163 > 91	10
		163 > 127	10
Deltametrina	34,85	181 > 152	20
		181 > 127	5

Inicialmente, foram realizadas infusões diretas dos padrões individuais dos pesticidas no espectrômetro de massas a fim de otimizar as respostas dos íons precursores. Foram monitoradas as respostas de dois íons do produto, modo MRM, sendo o mais abundante selecionado para a quantificação e o menos abundante para confirmação.

O UPLC-ESI-MS/MS foi operado em modo MRM com ionização por eletronebulização no modo íon positivo. A voltagem do capilar foi otimizada a 4,0 KV. Nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação a 400 °C com fluxo de 500 L h⁻¹ e argônio como gás de colisão com fluxo de 20 mL min⁻¹. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se uma coluna Acquity UPLC BEH C-18 (1,7 µm, 2,1 mm d.i. x 100 mm), a uma temperatura de 40 °C, empregando-se o seguinte gradiente de eluição: inicialmente com 45% (v/v) da fase A (Metanol) e 55% da fase B (solução aquosa contendo 0,1% ácido fórmico), com rampa linear até atingir 90% da fase A em 8 minutos, em seguida, retornando-se a 45% de A em 8,5 minutos, permanecendo nesta composição até 9 minutos, totalizando o tempo de análise de 9 minutos. A vazão da fase móvel foi mantida a 0,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 10 µL.

Na Tabela 2 são apresentados os tempos de retenção dos pesticidas, suas transições otimizadas para a quantificação e identificação, energia de colisão e voltagem do cone empregado no método.

Tabela 2. Condições para a determinação dos pesticidas por UPLC-ESI-MS/MS.

Composto	t _R (min)	Modo ionização	MRM transição (m/z)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
Metomil	1,43	+	162,5 > 87,8	10	15
			162,5 > 105,9	10	15
Tiametoxan	1,50	+	292 > 132	22	28
			292 > 211,2	12	28
Imidacloprido	1,93	+	256,1 > 175	21	23
			256,1 > 209	21	23
Dimetoato	2,36	+	230,1 > 125	16	16
			230,1 > 199	10	16
Aldicarbe	3,11	+	212,8 > 88,6	18	3
			212,8 > 115,8	15	30
Carbofurano	3,59	+	222 > 123	24	21
			222 > 165	12	21

Continua...

Continuação.

Composto	t_R (min)	Modo ionização	MRM transição (m/z)	Energia de colisão (eV)	Voltagem do cone (V)
Azoxistrobina	4,74	+	404,1 > 329	30	23
			404,1 > 372	12	23
Ciproconazol A	5,38	+	292 > 69,6	20	36
			292 > 124,6	28	36
Triadimenol	5,71	+	296 > 69,8	10	18
			296 > 98,9	15	18
Fenarimol	5,79	+	330,8 > 80,6	28	44
			330,8 > 267,7	24	44
Tebuconazol	6,4	+	308,1 > 70,1	21	38
			308,1 > 124,8	40	38

Depois de estabelecido, o método foi validado com base nos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão (recuperação) e precisão (repetibilidade) segundo documento orientador do Inmetro (2010).

A linearidade foi avaliada pela curva analítica por meio de padronização externa no solvente e por superposição de matriz com a construção da curva na faixa de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para GC-MS/MS e $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para UPLC-ESI-MS/MS.

O LD foi estabelecido pela injeção de cinco vezes do menor ponto da curva para o GC-MS/MS e para o UPLC-ESI-MS/MS. O LQ foi estabelecido como menor concentração quantificável com exatidão e precisão. Assim, foi estabelecido o menor nível de fortificação como o limite de quantificação. Para verificar a exatidão e a precisão (repetitividade) do método, foram avaliadas repetições em quintuplicata de amostras testemunhas de cebola fortificadas em dois níveis de concentrações $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ para análise no GC-MS/MS e $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ para o UPLC-ESI-MS/MS.

Os resultados obtidos foram expressos em termos de percentual (%) de recuperação e desvio padrão relativo (RSD – *relative standard deviation* – %). Todos os resultados foram avaliados e calculados utilizando-se curva na matriz por causa da forte presença do efeito matriz.

Resultados e Discussão

Para as análises por GC-MS/MS, 20 pesticidas foram analisados, monitorando-se duas transições para cada analito (Tabela 1 e Figura 1).

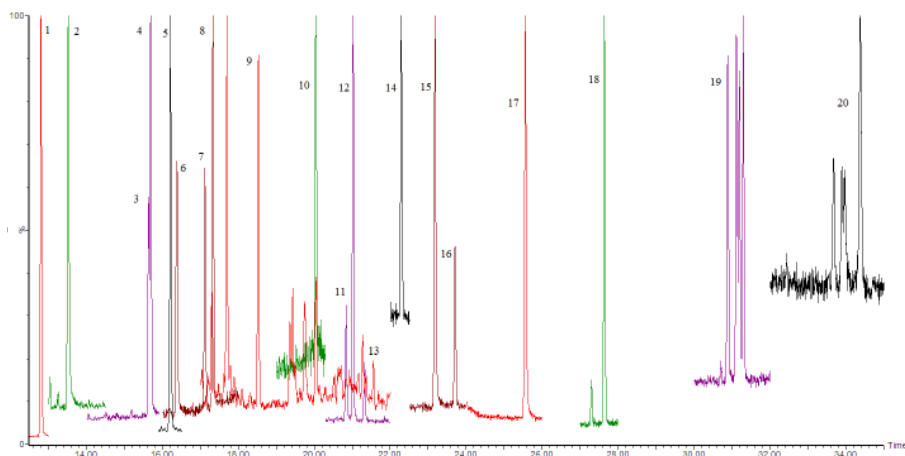


Figura 1. Cromatograma de íon total da amostra fortificada no LQ 0,01 mg Kg⁻¹ (GC-MS/MS) . 1) Hexaclorobenzeno; 2) Simazina; 3) Acetocloro; 4) Clorpirifós metil; 5) Metalaxil; 6) Clorpirifós; 7) Malation; 8) Aldrin; 9) Pendimetalina; 10) Endosulfan alfa; 11) Profenofós; 12) Oxadiazon; 13) Oxifluorfen; 14) Endosulfan beta; 15) Triazofós; 16) Endosulfan sulfato; 17) Iprodiona; 18) Lambda Cialotrina; 19) Cipermetrina; 20) Deltametrina.

Durante a validação, os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e efeito matriz foram avaliados. Para os pesticidas quantificados por GC-MS/MS, em relação à linearidade, o método apresentou o coeficiente de correlação ($R > 0,99$) para os pesticidas estudados na faixa de 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, estando de acordo com os padrões da Anvisa e do Inmetro (INMETRO, 2016; RODRIGUES et al., 2010).

Os limites de detecção (LD) para os pesticidas estudados variaram de 0,005 mg kg⁻¹ a 0,01 mg kg⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) foi de 0,01 mg kg⁻¹ a 0,05 mg kg⁻¹. Todos os LQ foram menores que os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela Anvisa para os pesticidas permitidos para cultura da cebola exceto para deltametrina – LMR 0,03mg kg⁻¹.

Para a exatidão, os valores de recuperação variaram de 63,1% a 96,2% e a precisão com desvio padrão relativo (RSD) de até < 11,5% para as duas fortificações (Figura 2). Na literatura, as recuperações são aceitáveis de 70% a 120% com coeficiente de variação até 20% (CALDAS et al., 2010; RIBANI et al., 2004).

Neste estudo, a recuperação ficou abaixo só para o hexaclorobenzeno. Nas demais, as recuperações foram aceitáveis e os desvios também. Trabalhos utilizando a metodologia QuEChERS para análise multirresíduos incluindo o hexaclorobenzeno são relatados por Paz et al. (2017) e Rashid et al. (2010) com recuperações abaixo do valor recomendado, 70-120%, para frutas e solo, respectivamente. Também, no método apresentado para a cebola, o hexaclorobenzeno não mostrou exatidão de análise e, portanto, não foi quantificado.

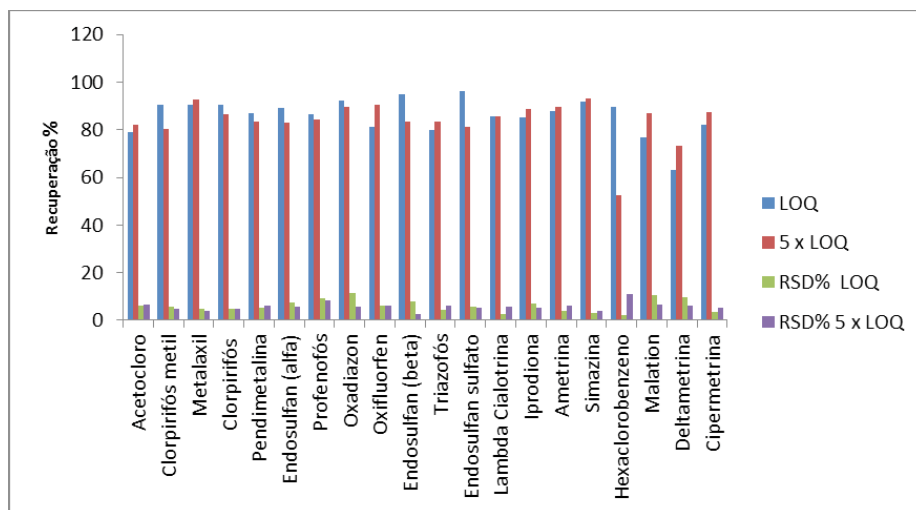


Figura 2. Recuperações e desvio padrão relativo (RSD%) das fortificações no 0,01 mg kg⁻¹ (LO) e 0,05 mg kg⁻¹ (5x LO) utilizando GC-MS/MS.

Para os pesticidas quantificados por UPLC-MS/MS a sensibilidade foi avaliada pelo modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), monitorando-se duas transições, sendo sensíveis para 11 pesticidas (Tabela 2 e Figura 3).

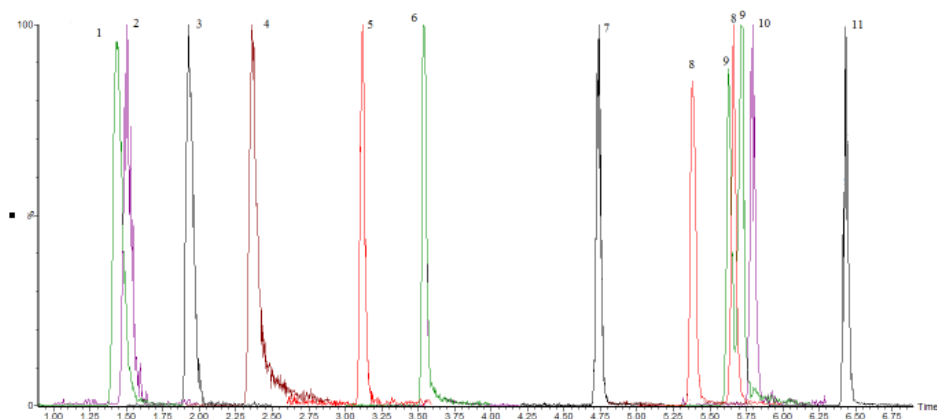


Figura 3. Cromatograma de íon total da amostra fortificada no LQ $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ (UPLC-ESI-MS/MS). 1) Metomil; 2) Tiametoxan; 3) Imidacloprido; 4) Dimetoato; 5) Aldicarbe; 6) Carbofurano; 7) Azoxistrobina; 8) Ciproconazol; 9) Triadimenol; 10) Fenarimol; 11) Tebuconazol.

O método apresentou coeficiente de correlação ($R > 0,99$) para os pesticidas estudados na faixa de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, atendendo o recomendado pela Anvisa e Inmetro (INMETRO, 2016; RODRIGUES et al., 2010).

O limite de detecção (LD) foi de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ e o limite de quantificação (LQ) foi de $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$ para os pesticidas, exceto para o fenarimol (LQ $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$). No caso do tiametoxan e imidacloprido, o LQ ficou acima dos limites máximos de resíduos definidos pela legislação brasileira, por meio da Anvisa, para a cebola, cujos valores são $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

As recuperações variaram de 64,5% a 89,2% e a precisão com desvio padrão relativo (RSD) de até $< 16,5\%$ (Figura 4). Observando-se a Figura 4, percebe-se que a recuperação do aldicarbe ficou próximo de 65% para os dois níveis estudados, ficando, assim, abaixo do nível aceitável, apresentado na literatura (70-120%) (CALDAS et al., 2010; RIBANI et al., 2004). Estudos realizados por Machado et al. (2017) e Ping et al. (2017), conseguiram recuperar mais de 70% do aldicarbe em frutas e vegetais empregando o QuEChERS com modificações. Para melhorar a recuperação desse composto, neste trabalho será preciso estudar alterações no QuEChERS proposto.

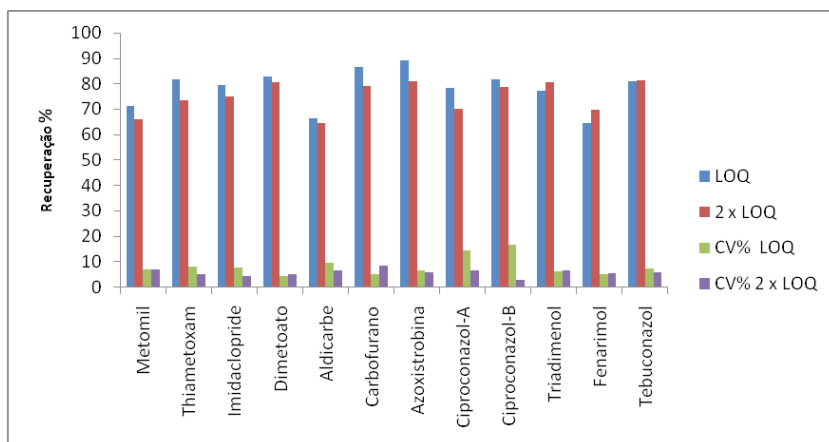


Figura 4. Percentual (%) de recuperações e desvio padrão relativo (RSD%) das fortificações no 0,1 mg kg⁻¹ (LQ) e 0,2 mg kg⁻¹ (2x LQ) utilizando UPLC-MS/MS.

Neste estudo, não foi detectada a presença dos 31 pesticidas analisados nas 15 amostras de cebola coletadas nos municípios de Casa Nova e Sento Sé.

Para a cebolicultura, nem todos os pesticidas analisados pelo método proposto são autorizados. Programas de monitoramento no Brasil como o Programa de Análise de Resíduos e Agrotóxicos em Alimentos da Anvisa (Para) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) detectaram pesticidas não autorizados para as culturas analisadas embora autorizado para outras.

A cebola está classificada como uma cultura com suporte fitossanitário insuficiente (CSFI) ou conhecida mundialmente como *minor crops*, para a qual as empresas produtoras de pesticidas demonstram pouco interesse em registrar formulações específicas, podendo gerar uma ilegalidade involuntária. Assim, programas de monitoramento podem servir de base para discussão e subsidiar políticas com relação ao registro de pesticidas para a cebola. Isso evidencia a importância da metodologia de análise incluir também, pesticidas sem LMR estabelecidos e não autorizados.

Conclusões

As condições cromatográficas e os parâmetros de fragmentação foram otimizados para a determinação por UPLC-ESI-MS/MS e GC-MS/MS dos 31 pesticidas em cebola, atendendo os limites máximos recomendados pela legislação brasileira.

O aldicarbe e o hexaclorobenzeno foram retirados da validação, pois não atingiram níveis aceitáveis de recuperação. As 15 amostras de cebola coletadas nos municípios de Sento Sé e Casa Nova no Estado da Bahia foram analisadas e não foi detectada a presença de nenhum dos pesticidas.

As curvas analíticas apresentaram valores de $R > 0,99$ para as faixas de concentração necessárias às aplicações. Os valores médios de recuperação obtidos em diferentes níveis de fortificação ficaram na faixa de 63,1 % a 96,2 %, com desvio padrão relativo (RSD) menor que 20%.

Os limites de quantificação do método (LQ) foram de 0,01 mg Kg⁻¹ para a técnica GC-MS/MS e 0,1 mg kg⁻¹ para a técnica UPLC-ESI-MS/MS. Os métodos se mostraram eficientes, rápidos, precisos, exatos e capazes de avaliar os pesticidas em amostras de cebola.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao convênio Embrapa-Monsanto, Funarbe e Facepe.

Referências

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, Rockville, v. 86, p. 412-431, 2003.

CALDAS, S. S.; DEMOLINER, A.; COSTA, F. P.; D'OCA, M. G. M.; PRIMEL, E. G. Pesticide residue determination in groundwater using SPE and HPLC-DAD and LC-MS/MS. **Journal Brazilian of Chemistry Society**, Campinas, v. 21, n. 4, p. 642-650, 2010.

CHOWDHURY, M. A. Z.; FAKHRUDDIN, A. N. M.; ISLAM, Md. N.; MONIRUZZAMAN, M.; GAN, S. H.; ALAM, Md. K. Detection of the residue of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography-mass spectrometry. **Food Control**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 457-465, 2013.

COSTA, N. D. (Ed.). **A cultura da cebola**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2012. (Coleção Plantar, 70).

DASENAKI, M. E.; BLETSOU, A. A.; HANAFI, A. H.; THOMAIDIS, N. S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the determination of spinosad, thiacloprid and pyridalyl in spring onions and estimation of their pre-harvest interval values. **Food Chemistry**, Oxford, v. 213, p. 395-401, dez. 2016.

HANOT, V.; GOSCINNY, S.; DERIDDER, M. A simple multi-residue method for the determination of pesticides in fruits and vegetables using a methanolic extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimization and extension of scope. **Journal of Chromatography A**, [Oxford], v. 1384, p. 53-66, 2015.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: documento de caráter orientativo: DOC – CGCRE – 008: revisão 03 – fev./2010. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2017.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**: documento de caráter orientativo: DOC – CGCRE – 008: revisão 05 - agosto 2016. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2017.

LÓPEZ, B. G.; GARCIA-REYES, J. F.; MOLIN-DIAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review. **Talanta**, [Cham], v. 79, n. 2, p. 109-128, jul. 2009.

LÓPEZ, M. G.; FUSSELL, R. J.; STEAD, S. L.; ROBERTS, D.; MCCULLAGH, M.; RAO, R. Evaluation and validation of an accurate mass screening method for the analysis of pesticides in fruits and vegetables using liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry with automated detection. **Journal of chromatography A**, [Oxford], v. 1373, p. 40-50, dez. 2014.

MACHADO, I.; GÉREZ, N.; PISTÓN, M.; HEINZEN, H.; CESIO, M. Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure. **Food Chemistry**, Oxford, v. 227, p. 227-236, 2017.

PAZ, M.; CORREIA-SA, L.; VIDAL, C. B.; LONGHINOTTI, E.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. Application of the QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in Brazilian fruit pulps by GC-ECD. **Journal of Environmental Science and Health Part B: pesticides, food contaminants and agricultural wastes**, Abingdon, v. 52, n. 1, p. 48-58, 2017.

PING, Z. H.; LIN, M.; LAN-QI, H.; JIAN-BO, C.; LI, Z. The optimization and establishment of QuEChERS-UPLC-MS/MS method for simultaneously detecting various kinds of pesticides residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography B**, Abingdon, v. 1060, p. 281-290, 2017.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica**, [São Carlos], v. 3, n. 1, 2011. Disponível em: <<http://scientiachromatographica.com/files/v3n1/v3n1a4.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2017.

RASHID, A. S.; NAWAZ, H.; BARKER, H.; AHMAD, I.; ASHRAF, M. Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography: tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [Oxford], v. 1217, n. 17, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310002967>>. Acesso em: 14 set. 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 14 out. 2017.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. A simple; efficient and environmentally friendly method for the extraction of pesticides from onion by matrix solid-phase dispersion with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, [Oxford], v. 678, n. 1, p. 82-89, 2010.

RODRIGUES, S. A.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G.; FURLON, E. B. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000500010>. Acesso em: 17 ago. 2017.

SHANSIPUR, M.; YAZDANFAR, N.; GHAMBARIAN, M. Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. **Food Chemistry**, Oxford, v. 204, p. 289-297, 2016.

SIVAPERUMAL, P.; ANAND, P.; RIDDHI, L. Rapid determination of pesticides residues in fruits and vegetables, using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Food Chemistry**, Oxford, v. 168, p. 356-365, 2015.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE 14365